製品コード CY217A

食品・環境分析用

TaKaRa

Cycleave®PCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0

説明書

本製品は、厚生労働省通知「腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157 の検査法について」（食安監発 1217 第 1 号）に収載されました。それに伴い、解析パラメータの設定方法を追記しております。

v201312Da

O157：H7 をはじめとする腸管出血性大腸菌（EHEC）は、血便と激しい腹痛を伴う出血性大腸炎、さらには溶血性尿毒症症候群を引き起こす病原性大腸菌の一群です。これらの重篤な症状の原因は、EHEC が産生する細胞毒素、ベロ毒素です。EHEC の検出において、この毒素遺伝子の有無を的確に、かつ迅速にチェックする検査方法の重要性が指摘されています。
本キットは、O157：H7 をはじめとする EHEC による食中毒の原因遺伝子であるベロ毒素遺伝子（VT1、VT2 遺伝子）を、リアルタイム PCR 装置を用いて検出するためのキットです。PCR 法は、ごく微量の DNA を鋳型として用いて、目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術であり、DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることが出来ます。PCR による増幅を蛍光標識プローブやインターカレーターを用いて、リアルタイムに測定する方法がリアルタイム PCR です。
本キットの増幅には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*® HS を使用しており、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。増幅産物の検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することが出来ます。プローブは片方の端が蛍光物質で、もう片方の端がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります（図 1 参照）。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることが出来ます。
本キットには、VT1 遺伝子および VT2 遺伝子を検出するための FAM 標識プローブと、インターナルコントロールとインターナルコントロール検出用の ROX 標識プローブが含まれています。二波長を同時にモニタリングすることで、一本のチューブで VT1 遺伝子および VT2 遺伝子の検出と、インターナルコントロールの検出による偽陰性のモニターが可能です。リアルタイム検出なので、電気泳動が不要であり、迅速に結果が得られます。
また、本キットでは従来品の CycleavePCR O-157（VT gene）Screening Kit（製品コード CY213；販売終了）の各コンポーネントのプレミックス化、ならびに検体調製（アルカリ熱抽出）に必要な試薬類の添付により、検出操作の簡便化を図っています。
なお、本キットでは VT1 遺伝子と VT2 遺伝子の識別はできません。

※ 本キットを用いる検出方法は厚生労働省通知「腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157 の検査法について」（食安監発 1217 第 1 号）に収載されました。

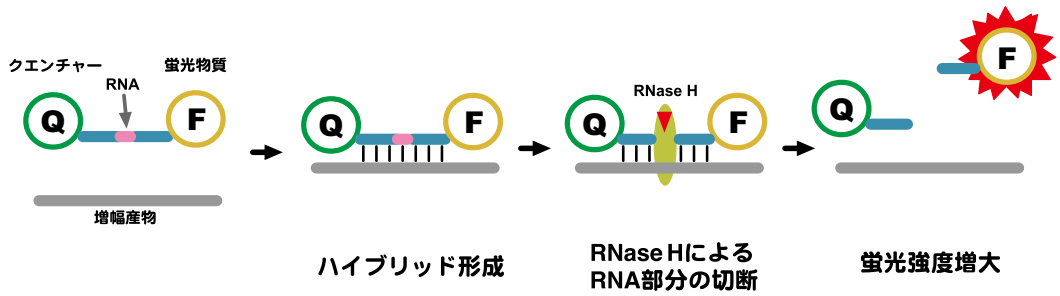


図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. キットの内容（25 μl 反応、50 回分）

1.	2 × Cycleave Reaction Mixture	2 × conc.	625 μl
2.	VT Primer/Probe Mix（FAM、ROX）＊	5 × conc.	250 μl
3.	dH_2O		1 ml
4.	NaOH Solution	50 mM	1.5 ml × 4
5.	Tris-HCl Buffer pH7.0	1 M	1 ml
6.	dH_2O（for Dilution）		1 ml
7.	VT1 Positive Control		150 μl（30 回分）
8.	VT2 Positive Control		150 μl（30 回分）

＊：プライマーは株式会社島津製作所で製造されたものです。蛍光標識プローブを含んでいますので、遮光に留意してください。
本プライマーでは、ベロ毒素 1 型（VT1）および 2 型（VT2、VT2vha、VT2vhb、VT2vp1）遺伝子を検出します。ターゲット遺伝子の増幅サイズは 171 bp です。

コンポーネント 1、2、3 は、製品に添付している小箱を利用し、4 ～ 8 のコンポーネントとは別に保管してください。

【コンポーネントの説明】
2 × Cycleave Reaction Mixture：インターナルコントロールを含む PCR 反応試薬です。
インターナルコントロール：
ターゲット遺伝子とは無関係な配列を有する DNA 分子で、偽陰性の判定を目的としています。全ての反応系に存在させることで、ターゲットが検出されない場合にインターナルコントロールの検出ができていれば、PCR 阻害が起こっていないと判断でき、サンプル中のターゲットが検出限界以下と判定できます。ターゲット、インターナルコントロールがともに検出されないなら、PCR が正常に進まなかったことがわかります。
ターゲット遺伝子：
標的となる遺伝子。このキットの場合、ベロ毒素遺伝子（VT1、VT2 遺伝子）のことです。
VT Primer/Probe Mix：プライマー・プローブの混合溶液です。プライマーにより、ターゲット遺伝子またはインターナルコントロールを増幅し、異なるレポーター色素が標識されたプローブにより、ターゲット遺伝子またはインターナルコントロールを検出します。ターゲット遺伝子検出用プローブは FAM、インターナルコントロール検出用プローブは ROX という蛍光物質が標識されています。
dH_2O：滅菌水です。
NaOH Solution：検体調製のためのアルカリ熱抽出時に使用する 50 mM NaOH 溶液です。
Tris-HCl Buffer pH7.0：アルカリ熱抽出後に中和するための溶液です。
dH_2O（for Dilution）：中和後の検体サンプルを希釈するために用いる滅菌水です。
VT1 Positive Control：VT1 遺伝子用陽性コントロールです。
VT2 Positive Control：VT2 遺伝子用陽性コントロールです。

II. 保存

－ 20℃（輸送、保存とも）
開封後は、コンポーネント 1 ～ 3、および 4 ～ 8 を別々の箱に入れ、それぞれ－ 20℃で保存してください。

III. キット以外に必要な機器など（主なもの）

【機器】
リアルタイム PCR 用増幅装置および専用チューブ
　Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
　Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
　　食品環境検査用ソフトウェア（日本語表示）
　　または、Thermal Cycler Dice Real Time System Software
　Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）など
ヒートブロック（95℃まで温度を上げられるもの）

【その他】
200 μl、20 μl、10 μl　各マイクロピペット
マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
卓上遠心機
微量高速遠心機

IV. 操作上の注意

1）リアルタイム PCR 用増幅装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
2）万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。
3）陽性と判定された検体は、さらに微生物学的な手法を用いて確認してください。
4）反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

　○ エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
　○ エリア 2：検体の調製を行います。
　○ エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

5）本キットはリアルタイム PCR 用増幅装置での解析によって結果判定を行います。
　リアルタイム PCR 用増幅装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 用増幅装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

V. 操作

1. サンプルの調製
   増菌培養液から菌体アルカリ熱抽出サンプルを調製する。
2. リアルタイム PCR 用増幅装置のセッティング
3. 反応液の調製と反応開始
   反応液を調製する。
   ↓
   反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、または検体サンプル、または陽性コントロールを添加する。
   ↓
   反応チューブをリアルタイム PCR 用増幅装置にセットし反応を開始する。
   ↓
4. 結果表示
   画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される。
   ↓
   反応終了
   ↓
   判定

V-1. サンプルの調製（エリア 2 で実施）

食品培養液からの腸管出血性大腸菌の DNA 抽出には、下記のアルカリ熱抽出法を推奨します。

【アルカリ熱抽出法】

食品培養液＊100 µl を 1.5 ml または 2.0 ml 容量のねじ口チューブに採取する。

↓
← 10,000 × *g*、10 分間遠心して上清を除く。
←沈渣に 50 mM NaOH Solution 緑 85 µl を添加し、100℃で 10 分間加熱処理する。
← 1 M Tris-HCl（pH7.0）紫 15 µl を加えて中和する。
← 2,000 ～ 10,000 × *g*、10 分間遠心する。

上清を検体サンプルとして用いる。
VT1、VT2 検出用の検体サンプルとして 1 反応に 5 µl を使用する。

＊：食品培養液は、それぞれ適切な標準プロトコールに従って食品サンプルから調製したものを用いる。

V-2. 反応液の調製と反応開始

本キットでは、1 本の反応チューブ内で VT1 および VT2 とインターナルコントロールの増幅産物を同時に検出します。正しい検出結果を得るために、VT1 陽性コントロール反応、VT2 陽性コントロール反応および陰性コントロール反応を一緒に行ってください。

（1）下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）
検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋ α 分調製し、各反応チューブに 20 μl ずつ分注し、軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして、滅菌水 5 μl を加えしっかりとふたをする。
必要本数は、サンプル数＋ 3 本（陰性コントロール反応として水を加えたもの、VT1 陽性コントロール反応、VT2 陽性コントロール反応）と設定する。

	液量（1 反応）	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 μl	1 ×
VT Primer/Probe Mix（5 × conc.）	5 μl	1 ×
検体サンプル or 陽性コントロール or 滅菌水	（5 μl）＊	
dH_2O	2.5 μl	
Total	25 μl	

＊：検体サンプルまたは陽性コントロール DNA は、ステップ（2）で加えるため、ここでは加えない。

【注意】
蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようご注意ください。
（エリア 3 へ移動）

（2）サンプル（鋳型）の添加（エリア 3 で実施）
陰性コントロール以外の各チューブに、検体サンプルまたは陽性コントロールを添加し、しっかりとふたをする。
反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 用増幅装置にセットする。

【注意】
反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

V-3. リアルタイム PCR 用増幅装置による増幅および検出、判定（エリア 3 で実施）

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 用増幅装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。
ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System（タカラバイオ）および Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）を使用した場合の簡単な操作方法と、結果の判定について示します。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System *II* および *Lite* の場合 】
（食品環境検査用ソフトウェア ver. 1.0）

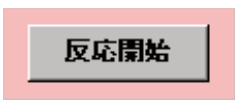
（1）ランファイルを新規作成し、“新規測定” 画面において解析タイプ＜＋／－判定（CycleavePCR Kit）＞を選択する。

＋／－判定（CycleavePCR Kit）は、食品環境検査用ソフトウェア ver.1.0 に搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software Ver.4.0 をご使用の場合は、＜ PM (M) Plus/Minus Assay 解析＞を使用します。
解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、弊社ウェブサイト資料請求のダウンロードサービス「Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードしてください。

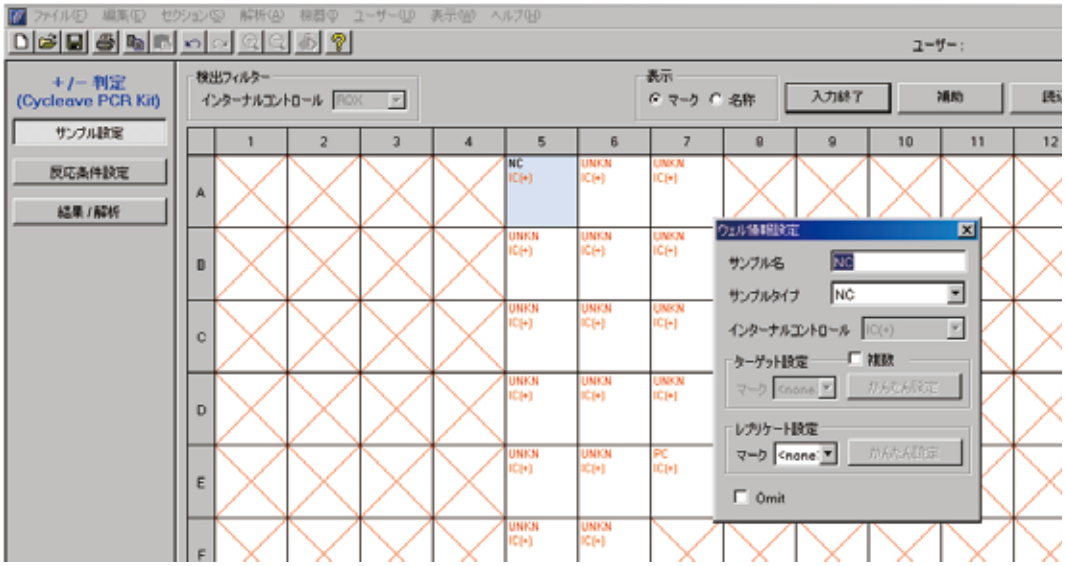
（2）“反応条件設定” 画面で PCR 条件が以下の条件になっていることを確認する。

初期変性（Hold）
　Cycle：1
　95℃　10 秒
3 step PCR
　Cycle：45
　95℃　 5 秒
　55℃　10 秒
　72℃　20 秒（検出）

（3）画面右下の “反応開始” ボタンをクリックして反応を開始する。



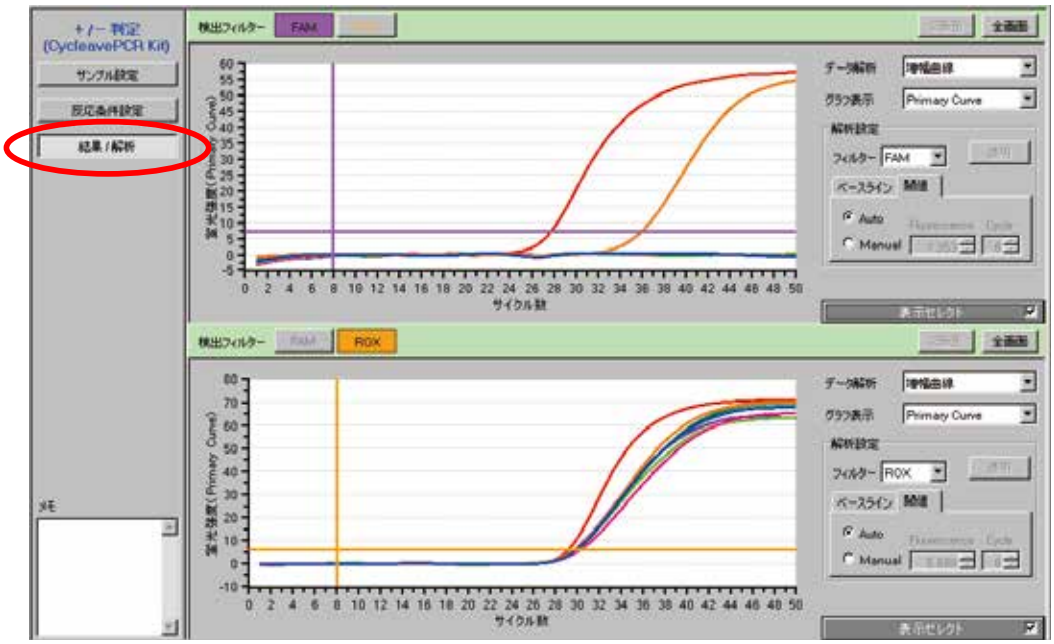
(4) “サンプル設定” 画面で “入力” ボタンをクリックし、ウェル情報設定を行う。反応に使用しないウェルは Omit 設定する。



インターナルコントロールは、デフォルトで ROX に設定されている（変更できません）。判定の信頼性を高めるため、2 連以上での反応を推奨する。

(5) 結果解析

1. 反応終了後、“結果 / 解析” ボタンをクリックする。

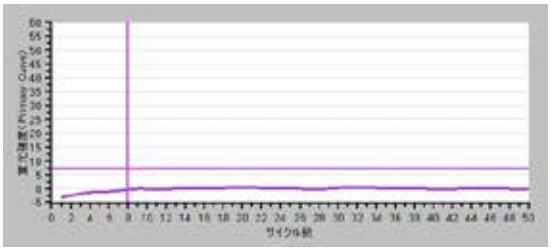


2 画面の上部にターゲット遺伝子検出の FAM フィルターでの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール（IC）検出の ROX フィルターでの増幅曲線が、表示される。（閾値は Auto で表示）

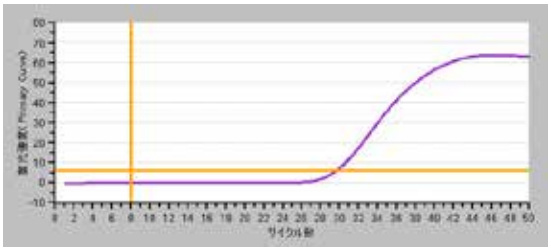
2. NC（陰性コントロール）、PC（陽性コントロール）での増幅曲線を確認する。

NC の増幅曲線の表示：表示セレクトで＜ N ＞を選択
FAM フィルターにおいて蛍光のシグナル変化が無いベースラインが得られ閾値を超えていないこと、ROX フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター
（ターゲット遺伝子検出）

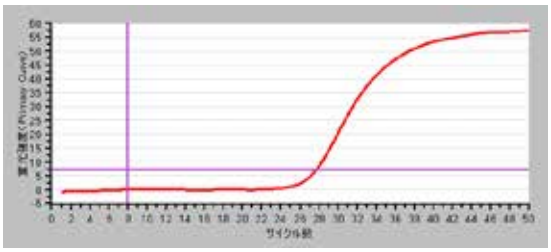


ROX フィルター
（IC 検出）

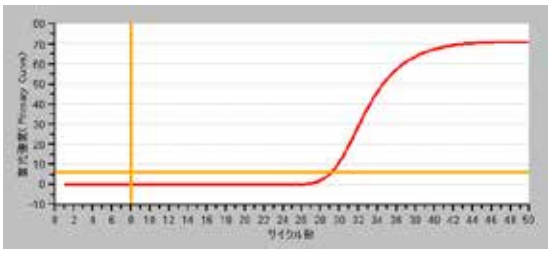


PC の増幅曲線の表示：表示セレクトで＜ P ＞を選択
FAM フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、ROX フィルターにおいても増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター
（ターゲット遺伝子検出）



ROX フィルター
（IC 検出）



3. サンプルの結果を、表示セレクトで＜ U ＞を選択し増幅曲線を確認する。

(6) 結果の表示
データ解析＜判定結果＞を選択する。

総合判定結果の表示について
陰性コントロール＜ N ＞、陽性コントロール＜ P ＞の表示
OK： コントロール反応が正常（反応系が正しく進んでいる）
OUT： コントロール反応が異常（反応系が正しく進んでいない）

検体サンプル＜ U ＞の表示
Posi.： ターゲット遺伝子の検出が陽性
Nega.：ターゲット遺伝子が検出限界未満
ND： 判定不能（PCR 反応が正しく進まなかった）
インターナルコントロール、ターゲット遺伝子とも検出せず、判定不能。
Error： 同一レプリケート番号の判定が異なる

※判定は、閾値を超えているか否かにより行います。

■判定結果についての注意事項

(1) 陰性コントロール反応において、総合判定解析が「OUT」となった。
● ターゲット遺伝子検出において、増幅曲線が得られた。
→ 試薬中に目的産物が混入した可能性がある。再度、コンタミネーションに注意し反応を行う。

(2) 陽性コントロール DNA 反応において、総合判定解析が「OUT」となった。
● ターゲット遺伝子、インターナルコントロールともに増幅曲線が得られなかった。
→ 何らかの原因で PCR 反応、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。反応液の調製にミスがないことを確認し、再度反応を行う。

● インターナルコントロール（ROX）では増幅曲線が得られるが、ターゲット遺伝子（FAM）では増幅曲線が得られなかった。
→ Primer/Probe Mix に問題がある、または、陽性コントロール DNA が分解している可能性がある。

(3) 検体サンプル反応において、総合判定解析が「ND」となった。
● ターゲット遺伝子、インターナルコントロールともに増幅曲線が得られなかった。
→ サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈する、または検体サンプルの再調製を行った後、再反応を行う。

【 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）の場合 】

増幅反応は以下の手順で行う。

（1）Advanced Setup で New Experiment を作成する。

（2）Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan Reagents または Other を選択する。（Other を選択した場合は Include Melt Curve の☑は外しておく）

（3）Plate Setup の Define Target にて Target Name を VT1VT2、Reporter を FAM、Quencher を（none）にしたものを作成する。

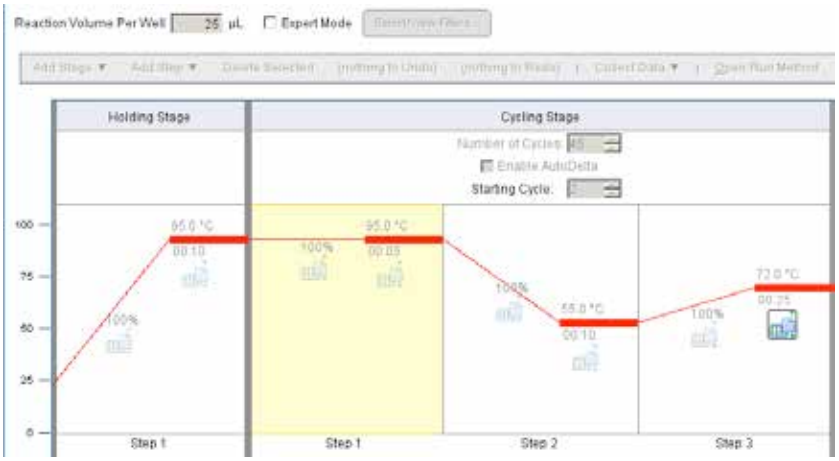
（4）Plate Setup の Define Target にて Target Name を IC、Reporter を ROX、Quencher を（none）にしたものを作成する。

（5）Define Samples にて NC、PC とサンプルを設定する。

（6）（3）、（4）、（5）で作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。
Passive Reference は（none）にする。

（7）Instrument タブをクリックし、以下の反応条件を入力する。

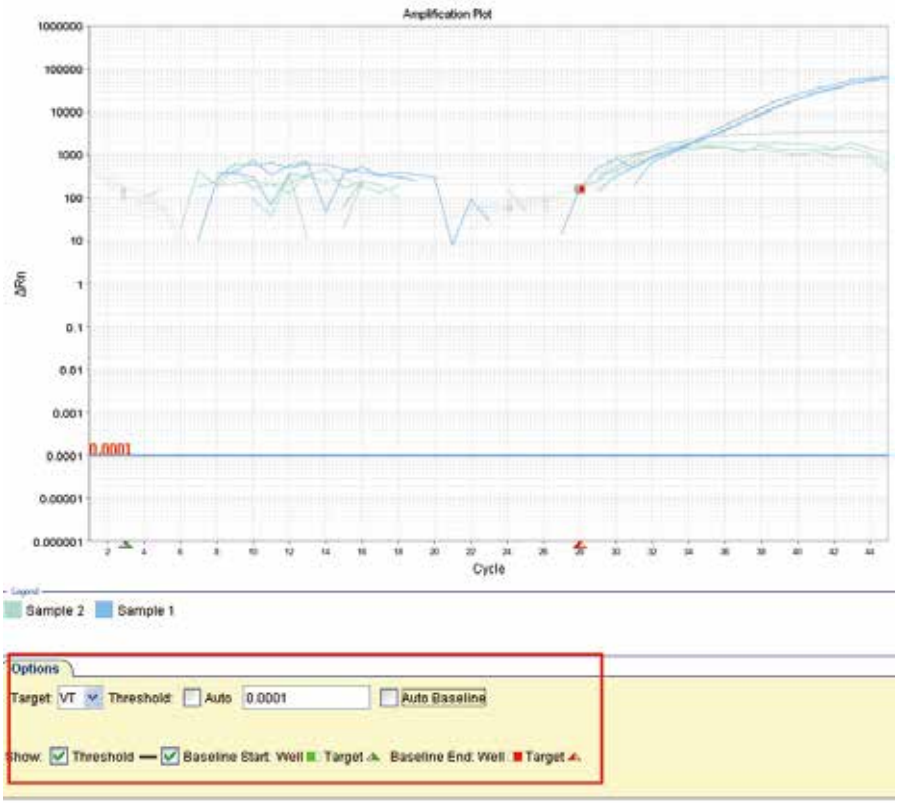
初期変性（Hold）
　Cycle：1
　95℃　10 秒
3 step PCR
　Cycle：45
　95℃　 5 秒
　55℃　10 秒
　72℃　25 秒（検出）



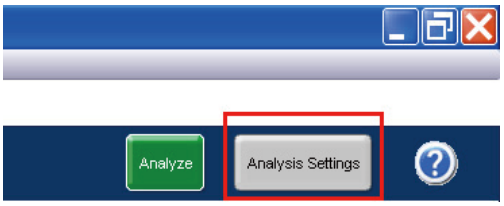
（8）反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。

(9) 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線を確認し、Threshold と Baseline を Manual 設定で適切な位置に修正する。

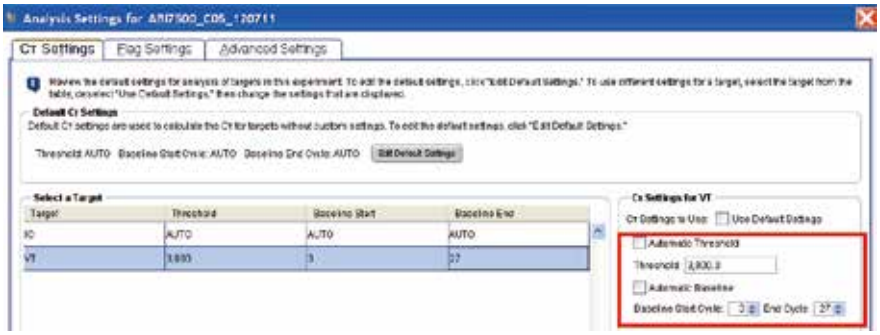
1. Amplification Plot の Options の設定
   Target: のドロップダウンリストから VT 遺伝子を測定した Target を選択する。
   Threshold: の Auto と Auto Baseline のチェックボックスの☑をはずす。
   Show: の Threshold と Baseline のチェックボックスに☑を入れる。

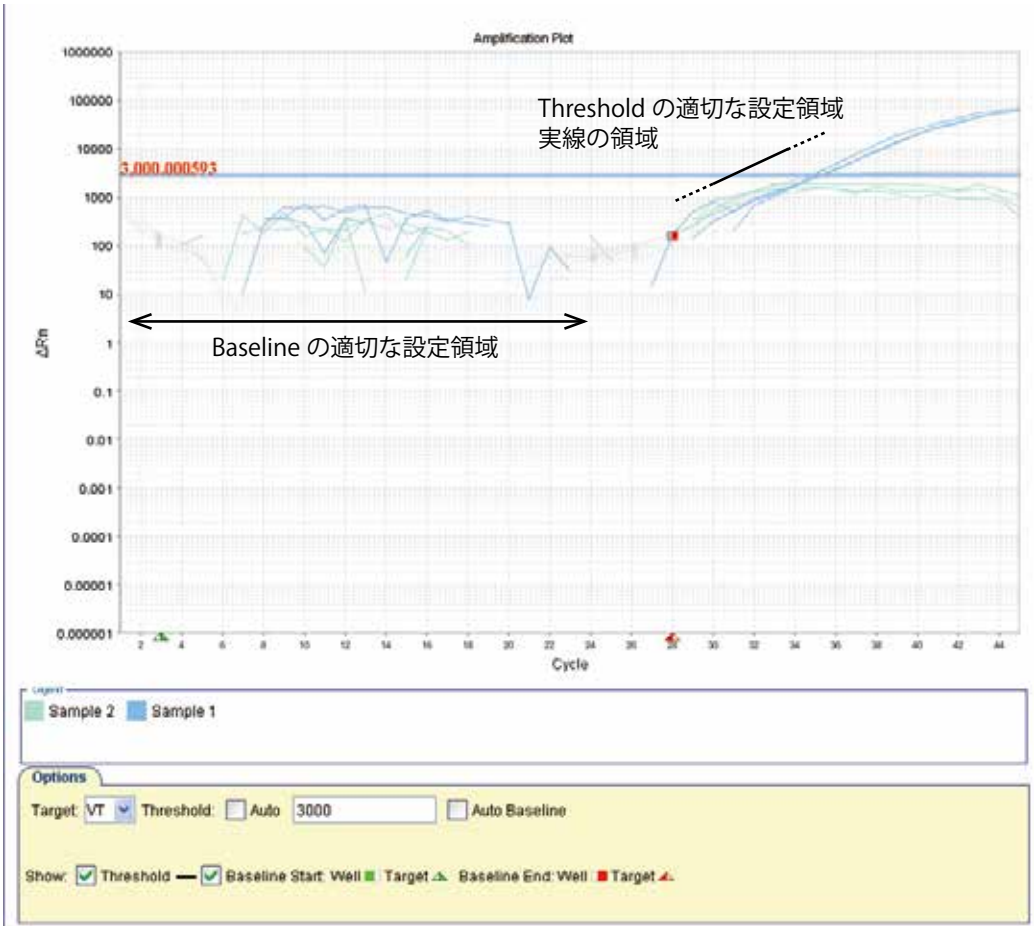


2. Analysis Setting 画面の表示
   画面右上の Analysis Settings ボタンをクリックする。

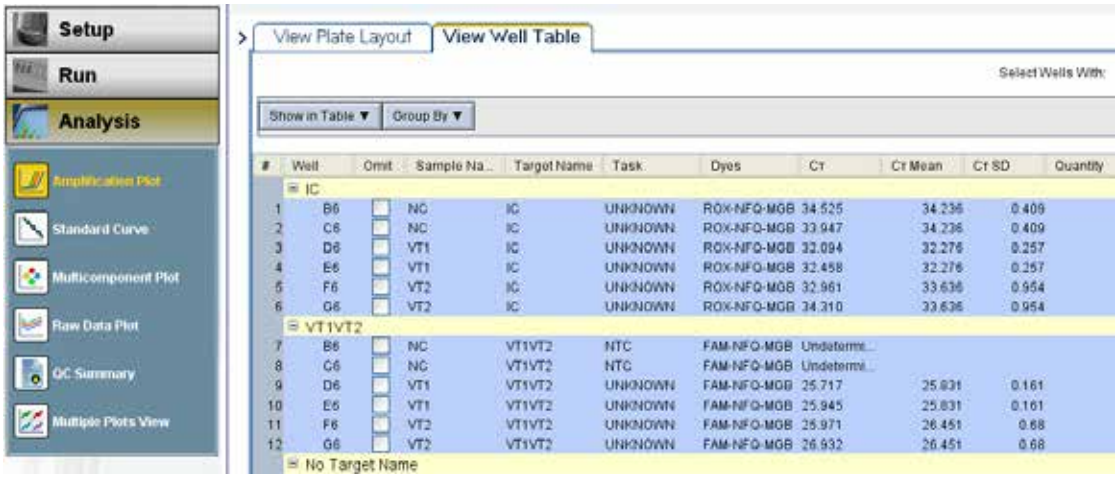


3. Analysis Setting 画面での設定
   Select a Target で VT 遺伝子を測定した Target を選択する。
   Ct Settings for *Target Name* で Threshold と Baseline の適切な値を設定する*。
   画面下の Apply Analysis Settings のボタンをクリックする。
   *：Threshold は Amplification Plot（Log 表示）が直線になっている範囲内に、Baseline は Amplification Plot の立ち上がりが認められる前までの範囲に設定する（下図参照）。





（10） View Well Table タブをクリックして結果のデータを参照できる。


Setup
Run
Analysis
Amplification Plot
Standard Curve
Multicomponent Plot
Raw Data Plot
QC Summary
Multiple Plots View
View Plate Layout
View Well Table
Select Wells With:
Show in Table ▼
Group By ▼
Well Omit Sample Na... Target Name Task Dyes Ct Ct Mean Ct SD Quantity
IC
1 B6 NC IC UNKNOWN ROX-NFQ-MGB 34.525 34.236 0.409
2 C6 NC IC UNKNOWN ROX-NFQ-MGB 33.947 34.236 0.409
3 D6 VT1 IC UNKNOWN ROX-NFQ-MGB 32.094 32.276 0.257
4 E6 VT1 IC UNKNOWN ROX-NFQ-MGB 32.458 32.276 0.257
5 F6 VT2 IC UNKNOWN ROX-NFQ-MGB 32.961 33.636 0.954
6 G6 VT2 IC UNKNOWN ROX-NFQ-MGB 34.310 33.636 0.954
VT1VT2
7 B6 NC VT1VT2 NTC FAM-NFQ-MGB Undetermi...
8 C6 NC VT1VT2 NTC FAM-NFQ-MGB Undetermi...
9 D6 VT1 VT1VT2 UNKNOWN FAM-NFQ-MGB 25.717 25.831 0.161
10 E6 VT1 VT1VT2 UNKNOWN FAM-NFQ-MGB 25.945 25.831 0.161
11 F6 VT2 VT1VT2 UNKNOWN FAM-NFQ-MGB 25.971 26.451 0.68
12 G6 VT2 VT1VT2 UNKNOWN FAM-NFQ-MGB 26.932 26.451 0.68
No Target Name

※ Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies 社）も同様な操作で使用できます。ただし、StepOnePlus Real-Time PCR System では、ROX の検出感度が低いため、全 target を同時に表示すると、ROX（IC）の増幅曲線が小さく表示されます。FAM と ROX の target を別々に表示させて解析してください。

VI. 判定結果表

判定結果表 1：サンプルを添加した場合（各コントロール反応の結果とあわせて最終判定を行うこと）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（VT1/VT2）	増幅シグナル（＋）	ベロ毒素遺伝子陽性＊1	ベロ毒素遺伝子陽性＊1
	増幅シグナル（－）	ベロ毒素遺伝子検出限界以下＊2	判定不能＊3

判定結果表 2：VT1 ポジティブコントロール

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（VT1/VT2）	増幅シグナル（＋）	VT1 検出系に問題なし	VT1 検出系に問題なし
	増幅シグナル（－）	VT1 検出系に問題あり＊4	判定不能＊3

判定結果表 3：VT2 ポジティブコントロール

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（VT1/VT2）	増幅シグナル（＋）	VT2 検出系に問題なし	VT2 検出系に問題なし
	増幅シグナル（－）	VT2 検出系に問題あり＊5	判定不能＊3

判定結果表 4：ネガティブコントロール（滅菌蒸留水を添加したもの）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（VT1/VT2）	増幅シグナル（＋）	VT1/VT2 コンタミネーションの疑い＊6	VT1/VT2 コンタミネーションの疑い＊6
	増幅シグナル（－）	VT1/VT2 コンタミネーションはない＊2	判定不能＊3

＊1：インターナルコントロールの（＋）/（－）に関わらず、VT1 あるいは／および VT2 遺伝子が陽性である。ネガティブコントロール反応の結果から反応系にコンタミネーションがなかったことを確認すること。

＊2：ポジティブコントロールの反応で（＋）となる（反応系に問題がない）ことを確認すること。

＊3：何らかの原因で PCR 反応またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、場合によっては検体の再調製が必要。

＊4：VT1 増幅用プライマーあるいは VT1 検出用プローブに問題があるか、VT1 ポジティブコントロールが分解している。

＊5：VT2 増幅用プライマーあるいは VT2 検出用プローブに問題があるか、VT2 ポジティブコントロールが分解している。

＊6：コンタミネーションの疑いがある場合は、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

VII. 参考文献

1) Takao,T., T. Tanabe, Y. -M. Hong, Y.Shimonishi, H. Kurazono, T. Yutsudo, C.Sasakawa, M. Yoshikawa and Y. Takeda (1988) Identity of molecular structure of Shiga-like toxin (VT1) from *Esherichia coli* O157 : H7 with that of Shiga toxin, *Microb. Pathog*., **5** : 357-369
2) Jackson, M. P., R. J. Neil, A. D. O' Brien, R. K. Holmes and J. W. Newland (1987). Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural gene for Shiga-like toxin Öüand Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933, FEMS *Microbio. Lett*., **44** : 109-114
3) Ito, H., A. Terai, H. Kurokawa, Y. Takeda and M. Nishibuchi (1990) Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91 : H21 isolated from a patient with the haemolytic uremic syndrome, *Microb. Pathog*., **8** : 47-60
4) Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes and A. D. O' Brien (1955) Cloning and Sequencing of a Shiga-like toxin typeII variant from a *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine, *J. Bacteriol*., **170** : 4223-4230

VIII. 関連製品

Cycleave®PCR O-157（VT1/VT2）Typing Kit（製品コード CY222）
Cycleave®PCR *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0（製品コード CY205）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
Plate Sealing Pads（製品コード 9090）
48 well snap plate（製品コード NJ700）
Flat cap for snap plate（製品コード NJ720）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）

IX. 注意

- 本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Cycleave、*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオの登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

ご注意
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. のクエンチャーのライセンスを受け、製造・販売されています。
本製品は、生命科学研究分野、食品検査を含む工業的検査分野、環境分析、法医学や動物診断における検出用です。また、これらの分野において、第三者に検出サービスを提供するために、本製品を商業目的で使用することができます。
ヒトの医療、治療、診断や動物の医療、治療、およびバイオテロに関連する分析、患者の処置あるいは治療方法を選択するための用途には使用できません。
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. 保有の特許（US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830）のライセンスのもと製造・販売されており、本製品と関連技術に関する権利は、上記特許の及ぶ範囲において Epoch Biosciences, Inc. に属します。下記注にある商業用途のライセンスは包含されていませんので、当該商業目的の使用には、Epoch Biosciences, Inc. からの別途ライセンスが必要です。

（注）別途ライセンスが必要な商業用途には以下の用途を含みます。
A: 本製品、あるいは本製品により派生するものを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。
B: 本製品、あるいは本製品により派生するものの使用権につき、第三者にリース・ライセンス・その他の権利付与をおこなうこと。
C: 本製品を含有するキットを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。

ライセンスについてお問い合わせ先：
タカラバイオ株式会社
Tel　077-543-6116　Fax　077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

[L4] Quencher
This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.
A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries).
There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and "commercial use" includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.

NANOGEN

[M40] Thermostable RNase H
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M46] PCR-Cycleave
This product is covered by the claims of Japanese Patent No. 4022522.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 outside the U.S. corresponding to the expired U.S. Patent No. 5,436,149.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201312Da